

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

Keemia instituut
Kolloid- ja keskkonnakeemia õppetool

Eleriin Peterson

β -LAKTAAMIDE JÄÄKIDE MÄÄRAMINE PIIMAS BIOSENSORI ABIL

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: Margarita Kagan

Toonika Rinken, vanemteadur

TARTU 2016

SISUKORD

SISSEJUHATUS	3
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	4
1.1 Ülevaade β -laktaamidest.....	4
1.2 Meetodid penitsilliinide jääkide määramiseks piimas.....	7
1.2.1 Kromatograafial põhinevad meetodid.....	7
1.2.2 Testid antibiootikumide jääkide määramiseks.....	7
1.2.3 Biosensorid	8
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	11
2.1 Kasutatud materjalid.....	11
2.2 Kasutatud aparatuur.....	11
2.3 Mõõtimise läbiviimine.....	11
2.4 Glükoosi oksüdaasi immobiliseerimine ja biosensori valmistamine.....	13
2.5 Lahuste valmistamine.....	13
2.6 Piimaproovide kogumine ja proovide ettevalmistus.....	13
2.7 Antibiootikumijääkide määramine Delvotest'i abil.....	14
3. TULEMUSED JA ARUTELU.....	15
3.1 Delvotest'i tundlikkuse alampiiri määramine penitsilliin G suhtes.....	15
3.2 Antibiootikumijääkide määramine ravialuste lehmade piimas biosensoriga.....	17
4. KOKKUVÕTE.....	20
5. KASUTATUD KIRJANDUS.....	21
.Summary.....	25
.Infoleht.....	26

SISSEJUHATUS

Euroopa Ravimiameti andmetel on β -laktaamid kõige levinumad veterinaarias kasutatavad antibiootikumid, moodustades 2010. aasta andmete põhjal kogu veterinaarsete antibiootikumide müügist Eestis 44%, Soomes 54% ja Rootsis koguni 63% [1]. Ehkki suurem osa antibiootikumide jääke ja metaboliite väljutatakse organismist uriiniga, eraldub hinnanguliselt 30-40% kasutatud penitsilliinidest piimaga [2].

Antibiootikumide jääkide lubatud sisaldus piimas on rangelt reguleeritud, sest need võivad põhjustada inimestel allergiat, resistentsete mikroobitüvede teket ning piimatööstuses mõjutavad antibiootikumide jäägid negatiivselt fermenteerimise protsessi juustu ja jogurti valmistamisel. Piim, kus antibiootikumide sisaldus on üle lubatud normi, kuulub hävitamisele. Usaldusväärse meetodi väljatöötamine antibiootikumide jääkide kiireks määramiseks, mis võimaldaks ka mittekvaliteetse piima eraldamist enne selle segunemist kvaliteetse piimaga, aitaks säästa tonnide viisi piima aastas. Ühtlasi tagaks see ka efektiivsema kontrolli toodetava piima kvaliteedi üle ning võimaldaks kasutada piima, mis eeldatava antibiootikumide sisalduse tõttu kuulub hetkeseisuga hävitamisele. Praegusel ajal selline meetod piima analüüsimiseks puudub.

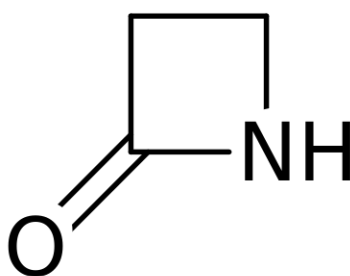
Käesolev töö on üks osa suuremast projektist, mille eesmärgiks on välja töötada biosensorrivi veterinaarias enamkasutatavate antibiootikumide jääkide kiireks määramiseks toorpiimas. Uuritakse ravil olevate ja ravijärgsete piimalehmade piima ja selles olevate penitsilliinide hulka kuuluvate antibiootikumide jääkide sisalduse kiire määramise võimalusi. Töö eesmärgiks on uurida penitsilliinide jääkide määramise võimalusi biosensoriga ning võrrelda saadud tulemusi käesoleval ajal laialt kasutatava Delvotesti abil tehtavate piima analüüsidega.

Bakalaureusetöö koosneb kahest osast. Teoreetilises osas antakse ülevaade β -laktaamsetest antibiootikumidest ja nende kasutamisest veterinaarias ning võimalustest nende antibiootikumide jääkide määramiseks piimas. Töö eksperimentaalses osas uuriti biosensoriga β -laktaamsete antibiootikumide jääkide määramise võimalusi ravidaluste lehmade piimas ja võrreldi saadud tulemusi Delvotest SP NT abil saadud tulemustega.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ülevaade β -laktaamidest

β -laktaamsete antibiootikumide struktuuri põhiliseks osaks on neljaosaline tsükliline amiid, mis koosneb ühest lämmastiku aatomist ja kolmest süsiniku aatomist, millest üks süsinik on seotud hapnikuga, moodustades karbonüülrühma. Sellist struktuuri nimetatakse β -laktaamseks ringiks (joonis 1).

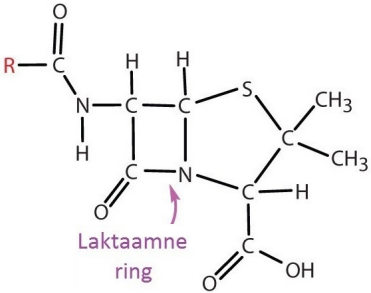
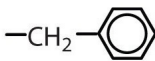
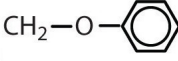
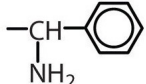
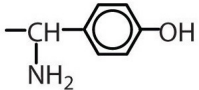
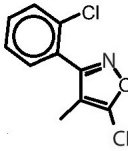


Joonis 1. β -laktaamne struktuur

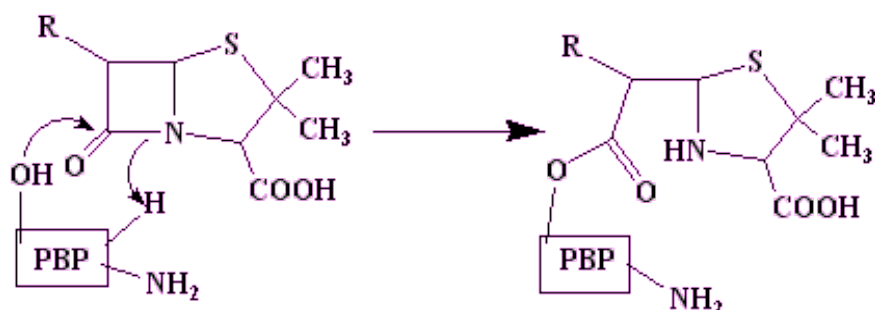
β -laktaam on oma nime saanud selle järgi, et selles asuva neljalülilise tsükli β -asendis olev süsinik on asendunud lämmastiku aatomiga. Tänu aatomite vaheliste sidemete pingele on β -laktaamsel ringil suur reaktsioonivõime, mis tagab paremad hüdrolyüüsi võime võrreldes näiteks lineaarsete amiididega kuna seal olev karbonüülne süsinik saab käituda reaktsioonis elektrofiilina [2-5]. Tänu sellele kasutatakse β -laktaamset ringi sisaldavaid antibiootikume laialt grampositiivsete ja gramnegatiivsete bakterite raviks veterinaarias kogu maailmas [5].

β -laktaamsete antibiootikumide tuntuim grupp on penitsilliinid. 1928. aastal avastas Alexander Fleming *Penicillium notatum* poolt toodetava stafülokokke pärssiva ühendi, mis nimetati penitsilliiniks [5]. Hiljem on leitud mitmeid penitsilliiniga sarnaseid ühendeid, mida koos kutsutakse penitsilliinideks. Kõikides penitsilliinides on 6-aminopenitsilliin happe (6-APA) ehk penami struktuur (tabel 1), mis koosneb β -laktaamsest struktuurist ning selle külge seotud tiasolidiini tsüklist [2,6,7]. Penitsilliinide gruppi kuuluvad antibiootikumide keemilised struktuurid erinevad teineteisest vaid kõrvalahela poolest (tabel 1).

Tabel 1. Penitsillinide grupp kuulumad antibiootikumid ja nende struktuurid.

Penaami struktuur kõrvalahela ja neid ühendava karbonüülse süsinikuga	R - Grupp	Antibiootikumi nimi	IUPAC
		Bensüülpenitsilliin ehk Penitsilliin G	(2S, 5R, 6R)-3,3-dimetüül-7-okso-6-(2-fenüülsetetamido)-4-tia-1-asabitsüklo[3.2.0]heptaan-2-karboksüülhappe
		Penitsilliin V	3,3-dimetüül-7-okso-6-(2-fenoksüatsetamido)-4-tia-1-asabitsüklo[3.2.0]heptaan-2-karboksüülhappe
		Ampitsilliin	(2S,5R,6R)-6-([(2R)-2-amino-2-phenülatsetüül]amino)-3,3-dimetüül-7-okso-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-
		Amoksitsilliin	(2S, 5R, 6R)-6-([(2R)-2-amino-2-fenülatsetüül]amino)-3,3dimetüül-7-okso-4-tia-1-asabitsüklo[3.2.0]heptaan-2- karboksüülhappe
		Kloksatsilliin	(2S, 5R, 6R)-6-([3- (2-klorofenüül)-5-metüül-oksasool-4-karbonüül] amino)-3,3-dimetüül-7-okso-4-tia-1-asabitsüklo[3.2.0]heptaan-2-karboksüülhappe

Penitsilliinid toimivad bakteri rakuseina sünteesi pärssivate inhibiitoritena. Bakteri rakuseina moodustab polümeerne peptidoglükaani kiht, mis koosneb N-atsüülmuraanhappe ja N-atsetüülglikoosamiini molekulidest, mis on omakorda ristseotud peptiidi kõrvalahelate abil. Ristsidemete teket katalüüsib ensüüm PBP (penicillin-binding protein), mis paikneb bakteri tsütoplasma membraanil. Penitsilliinid seonduvad PBP ensüümi külge, mille tulemusena β -laktaamne ring avaneb kuna ensüümis olev hüdroksüülrühm (-OH) seondub β -laktaamses ringis oleva karbonüülrühmaga ning takistab ensüümi tööd (joonis 2). Ristsidemete vähene hulk tingib nõrga rakumembraaniga bakteri teket ja viib viimase purunemiseni [5,10,11].



Joonis 2. Penitsilliinide toimemehhanism kehas oleva raku seina ristsidemeid sünteesiva ensüümi PBP (*penicillin-binding protein*) suhtes.

Penitsilliin G on esimene antibiootikum, mida hakati meditsiinis laialdaselt kasutama ja seda peetakse üheks parimaks antibiootikumiks grampositiivsete bakterite suhtes, kuid grammnegatiivsete bakterite poolt põhjustatud haiguste raviks enamasti see ei sobi, kuna grammnegatiivsed bakterid sünteesivad β -laktamaasi, mis takistab antibiootikumi sidumist bakteri rakuga [2,5].

Pikaajalisel kasutamisel kujuneb bakteritel antibiootikumide suhtes resistentsus, mis põhjustab vajaduse modifitseerida antibiootikumide struktuuri. Tuntumateks keemiliselt modifitseeritud penitsilliinideks on ampitsilliin ja amoksitsilliin, mis sisaldavad erinevalt tavalisest penitsilliinist aminorühma, mis on struktuuris α -asendis. Ampitsilliin sobib nii grampositiivsete kui ka osade grammnegatiivsete bakterite raviks, kuna selles olev struktuuriline muudatus laseb siseneda antibiootikumil grammnegatiivse bakteri raku välismise kesta, kus ampitsilliin päsib rakuseina edasist sünteesi [5,9]. Struktuuriliselt erinevad ampitsilliin ja amoksitsilliin selle poolest, et amoksitsilliin sisaldab oma struktuuris veel hüdroksüülrühma.

Kloksatsilliini kasutatakse penitsilliin G suhtes resistentsuse saavutanud stafülokokk-infektsioonide raviks, mida põhjustavad grampositiivsed β -laktamaasi tootvad bakterid. Selleks on antibiootikumis kõrvalahel, mis ei lase β -laktamaasil, ehk ensüümil, mis muudab bakteri raku antibiootikumi suhtes resistentseks, antibiootikumi külge siduda.

Penitsilliine manustatakse piimalehmadele süstimise teel, sest penitsilliinid on happelises keskkonnas ebastabiilsed ning lagunevad maos. Antibiootikumid satuvad süstimisel esmalt verre ning kanduvad seejärel koos vere, hapniku ning toitainetega erinevatesse rakkudesse üle kogu keha kaasaarvatud piimanäärmetesse.

Penitsilliinid väljuvad organismist uriini ning kuni 30-40% ulatuses piimanäärmetest erituva piima kaudu. Seetõttu on antibiootikumide jääkide sisaldus piimas rangelt reguleeritud piinormidega (MRL - maximum residue limits), mis näitavad maksimaalset lubatud antibiootikumide jääkide kontsentratsiooni piimas. Penitsilliin G, amptisilliini ja amoksitsilliini puhul on maksimaalseks lubatud kontsentratsiooniks piimas 4 ppb ning kloksatsilliini puhul 30 ppb [12].

1.2 Meetodid penitsilliinide jääkide määramiseks piimas

β -laktaamide jääkide määramiseks piimas on mitmeid erinevaid meetodeid. Tänapäeval kasutatakse kõige rohkem kromatograafial põhinevaid meetodeid ning mikrobioloogilisi ja immuunretseptor teste. Klassikalistele analüütilistele meetoditele pakub alternatiivi biosensor meetodite välja töötamine. Biosensorite eeliseks on kiirus, süsteemi kompaktsus ja lihtsus. Kõigi meetodite võrdlus on toodud tabelis 2.

1.2.1 Kromatograafial põhinevad meetodid

Antibootikumide jääke on võimalik määrata nii gaas-, vedelik- kui ka kõrgefektiivsevedelikkromatograafia. Tänapäeval rohkem kui 80% analüütilistest meetoditest piimas antibiootikumi jääkide määramiseks põhinevad kõrgefektiivsel vedelikkromatograafia-massispektromeetrilisel (HPLC-MS) meetodil, kuna siiani on see kõige usaldusväärsem meetod antibiootikumide kvantitatiivseks määramiseks [13]. Sellist meetodid kasutatakse ka näiteks mikrobioloogiliste testiga positiivse tulemuse saadud proovide edasiseks uurimiseks. Kuigi meetod võimaldab nii kvalitatiivset kui ka kvantitatiivset analüüsi ning määramispiir on penitsilliinide puhul alla 1 ppb on see meetod kallis ning probleemiks on proovide ettevalmistuseks ja testimiseks kuluv aeg, mis võib ulatuda 1 või 2 päevani [14,15].

Kromatograafial põhinevad meetodid ei võimalda teha analüüse reaalajas. Proovide ettevalmistuseks tuleb need tavaliselt homogeniseerida ja määratav aine proovi maatriksist ekstraheerida [16,17].

1.2.2 Testid antibiootikumide jääkide määramiseks

Erinevad mikroobse inhibeerimise ja immuunretseptor testid antibiootikumide jääkide määramiseks piimas on odavad ja lihtsad ning neid on võimalik kasutada piima kohapealseks analüüsiks. Nende puudusteks on analüüsidele kuluv aeg (3-24 tundi) ning subjektiivne tulemuste tõlgendamine.

Mikrobioloogiliste testide hulka kuuluvad - Delvotest, Brilliant Black Reduction Test, Valio T101 test, Copan microbial inhibitor test, Lumac rapid antibiotic test ja Arla micro test [18]. Eestis laialt kasutataval Delvotestil on kasvusöötmel *Bacillus stearothermophilus* bakter koos pH indikaatoriga. Pärast piima proovi lisamist testile inkubeeritakse seda teatud

temperatuuril. Antibiootikumide puudumisel proovis värvub test lillast kollaseks kuna piimas olevad bakterid hakkavad kasvama ning selle tulemusel muutub ka proovi pH, mille registreerib kasvusöötmes olev pH indikaator ning põhjustab silmaga nähtava värvimuutuse [19]. Delvotesti tundlikus on penitsilliin G suhetes 1,5ppb kuid testi tulemuste saamiseks kuluv aeg on kolm tundi.

Immuunretseptor testide toimemehhanism seisneb selles, et omavahel reageerivad antikeha, ensüüm ja retseptor [20]. Piima proov koos konkureeriva ensüümi antikehadega asetatakse kaetud katseklaasi, mille sisu segatakse kas toatemperatuuril või inkubeerides. Segamise käigus seonduvad testi seintele piimas olevad antibiootikumijäägid või konkureeriv ensüüm. Seejärel katseklaas pestakse ning lisatakse värviilmutit, mis seondub tekkinud kompleksile, et tulemus muutuks silmaga nähtavaks. Värv intensiivsust mõõdetakse spektrofotomeetriga ja võrreldakse antibiootikumi standardlahusega. Kui testi värvus on intensiivsem kui standardlahus tähendab see, et proov ei sisaldanud antibiootikume, kui aga test on kahvatuma värviga siis viitab see antibiootikumide olemasolule [18]. Testid on väga kompaktsed ning tulemused saab vähemalt kümne minuti pärast. Sobivad ideaalselt täpsustavaks analüüsiks mikrobioloogiliste testidega saadud tulemuste kvantitatiivseks määramiseks.

1.2.3 Biosensorid

Biosensorid on analüütilised seadmed, mis muudavad biokeemilise reaktsiooni signaali mõõdetavaks signaaliks. Biosensorid koosnevad bioäratunnustamismehhanismist ja signaali muundurist. Biosensorid on kompaktsed, töötavad nii täisautomaatselt kui manuaalselt ning võimaldavad teha reaajas kiireid analüüse. Piimas penitsilliinide määramiseks kasutatavad biosensorid võib klassifitseerida nende bioäratundimismehhanismi alusel – ensüümil või retseptoril põhinevateks, mikrobioloogilisteks, immunobiosensoriteks.

Retseptoril või ensüümil põhinevate biosensorite tööpõhimõte tugineb bioäratundmis reaktsioonil, kus spetsiifilised ensüümid või retseptorid reageerivad antibiootikumide molekulidega ning selle reaktsiooni substraadid või produktid detekteeritakse sobiva anduri abil. Retseptor/ensüüm biosensorite tavaliseks signaali muunduriks on optilised või elektrokeemilised detektorid [21,22]. Kõige tavalisem optilise detektoriga retseptor/ensüüm biosensoris on pinnaplasmonresonants (SPR). SPR biosensoril on tavaliselt väga madal

avastamispääir - alla kehtestatud piirnormi (MRL). Penitsilliini määramispääiriks on 1-2 ppb ja kloksasilliini määramispääiriks on 7-8ppb. SPR biosensorite puudused on nende kõige hind ja analüüsi aeg, mis võib olla kuni paar päeva [23-29].

Immunosensorid on suurim grupp biosensoreid, mida kasutatakse antibiootikumide jääkide tuvastamiseks piimas. Seda tüüpi biosensorid põhinevad antigeeni/antikeha bioäratundmis reaktsioonil ning kõige sagedamini on signaali muunduriks elektrokeemiline või optiline andur. Immunosensorid on väga selektiivsed. Analüüsi kiirus sõltub inkubatsiooniajast, mis kulub antigeeni/antikeha kompleksi moodustamiseks. Lisaks võtab aega ka katse järgne sensori täielik taastamine. Määramispääiriks penitsilliini puhul on 0,8 ppb aga ampitsilliini puhul näiteks 3,9 ppb [36].

Kokkuvõtlik ülevaade piimas penitsilliinide jääkide määramise võimalustest on toodud tabelis 2.

Tabel 2. Erinevad meetodid penitsilliinide jääkide määramiseks piimas.

Meetod	Antibiootikum	Määramispiir	Analüüsi aeg	Plussid / miinused	Viide
Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC)	Ampitsilliin, penitilliin G penitsilliin V	~ 1 ppb	~ 90 minutit	Spetsiifiline, tundlik / Kallis, aeganõudev	[14,15,37]
Mikroobne inhibeerimine	penitsilliin G, amoksitsilliin, ampitsilliin	1,5 ppb penitsilliin G 2,5 ppb amoksitsilliin 3,0 ppb ampitsilliin	~ 3 tundi	Lihtne kasutada, odav kättesaadav / Aeganõudev	[19]
Immuun-retseptor test	β -laktaamsed antibiootikumid	5 ppb amoksitsilliin, 4 ppb ampitsilliin, 33 ppb kloksatsilliin, 3 ppb penitsilliin G	~ 10-15 minutit	Tundlik	[38]
Ensüüm/retseptor biosensor	β -laktaamsed antibiootikumid	1-2 ppb penitsilliin	~ 24 tundi	Selektiivne /Kallis	[23-29]
Immunosensorid		0,8 ppb penitsilliin 3,9 ppb ampitsilliin	~ 5 minutit	Kiire, selektiivne	[36]

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Kasutatud materjalid

Bensüülpenitsilliin kaaliumsool; $C_{16}H_{17}KN_2O_4S$; AppliChem; min. 98%

Glükoos; $C_6H_{12}O_6$; Sigma; min. 99,5%

Glükoosi oksüdaas; eraldatud *Aspergillus niger* seenest; 17300 U/mg; Sigma; Lot: 079K7450V

Kaaliumdivesinikfosfaat; KH_2PO_4 ; AppliChem; min. 99,5%

Kaaliumhüdrosiid; KOH; Riedel-de Haen; min. 85%

Nailon-6,6 niit: Oja, Türgi; diameeter 25 μm

Delvotest SP NT: DSM Food Specialties B.V.

2.2 Kasutatud aparatuur

Termovann Sky Line TW2.03; Elmi.

Analüütiline kaal XS105 Dualrange; Mettler Toledo; täpsus $\pm 0,01$ mg.

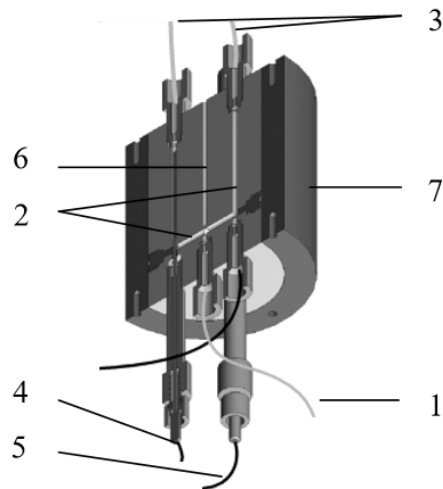
Analüütiline kaal PB 602-S/FACT; Mettler Toledo; täpsus $\pm 0,01$ g.

pH meeter : Seven Easy; Mettler Toledo; täpsus $\pm 0,02$ pH ühikut.

Fiiber optiline hapniku andur: Tartu Ülikool, Füüsika Instituut

2.3 Mõõtimise läbiviimine

Mõõtesüsteemi keskseks osaks on kahe kanaliga silindriline mõõterakk (joonis 3). Mõõterakku on paigutatud kaks hapnikutundliku materjaliga kaetud kvartsfiibrit, mis on valmistatud Tartu Ülikooli Füüsika Instituudis ning mille töö põhineb fosforestsentsi kustutamisel hapniku poolt. Ühele kvartsfiibrile on keritud immobiliseeritud glükoosi oksüdaasiga niit ning teisele nn. võrdlusandurile - puhas niit.



Joonis 3. Kasutatud mõõterakk: 1 - proovi sissevool; 2 - piima voolukanalid ; 3 – proovi väljavool; 4 – glükoosi andur ; 5 - võrdlusandur ; 6 - temperatuuriandur ; 7 - silindriline messingist ahi püsiva temperatuuri hoidmiseks [39].

Mõõteraku kanalis, kus asub andur immobiliseeritud glükoosi oksüdaasiga toimub glükoosi oksüdeerumine glükoosi oksüdaasi toime. Võrdlusandur, mille peale on keritud ilma ensüümita niit difusiooni ühtlustamiseks, võimaldab elimineerida hapniku fluktuatsioonide mõju mitteensümaatiliste protsesside tulemusel (voolukiiruse ja temperatuuri kõikumised). Voolukiiruseks katsete ajal oli 3 ml/min, temperatuur süsteemis oli 37° C.

Biosensoris toimuvat äratundmisreaktsiooni iseloomustati hapniku kontsentratsiooni vähenemise kaudu. Mõõtmised viidi läbi diferentsiaalrežiimis. Äratundmisreaktsiooni iseloomustava parameetri - tasakaaluolekule vastava maksimaalse signaali muutuse (parameeter A) - arvutamiseks kasutati oksüdaasidel baseeruvate biosensorite dünaamilist mudelit :

$$c_{O_2}(t)/c_{O_2}(0) = A \exp(-Bt) - 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \frac{\tau_s}{\frac{n^2}{B} - \tau_s} \left[\exp(-Bt) - \exp\left(\frac{-n^2 t}{\tau_s}\right) \right] + (1 - A) \quad (1),$$

kus $c_{O_2}(t)$ on lahustunud hapniku kontsentratsioon ajahetkel t ja $c_{O_2}(0)$ hapniku kontsentratsioon reaktsiooni algusmomendil $t=0$ ja τ_s hapnikuanduri inertsia iseloomustav suurus. A on tasakaaluolekule vastav maksimaalse signaali muutus ja B reaktsiooni kineetiline parameeter.

Biosensori väljundsignaal registreeriti automaatselt 0.1 s intervalliga ja salvestati arvuti abil, kasutades originaalset tarkvara OxySens 2.0. Andmete töötlemiseks ja väljundsignaali iseloomustavate parameetrite arvutamiseks kasutati programme SigmaPlot 12.0 ja Microsoft Excel.

2.4 Glükoosi oksüdaasi immobiliseerimine ja biosensori valmistamine

Glükoosi oksüdaas immobiliseeriti nailon-6,6 niidile. Niit asetati 10 minutiks dimetüülsulfaati lahusesse temperatuuril 50 °C seejärel pesti jääkülma metanooliga ning 0,1 M fosfaatpuhverlahusega (pH = 6,5). Edasi asetati niit 60 minutiks toatemperatuuril olevasse 12,5% glutaaraldehüüdi vesilahusesse. Selle aja möödudes pesti niit 0,1 M fosfaatpuhverlahusega ning kanti peale glükoosi oksüdaasi lahus. Niidil lasti kaks tundi toatemperatuuril glükoosi oksüdaasi lahuses seista ning seejärel 24 tundi temperatuuril 4 °C. Pärast 24 tunni möödumist pesti niiti puhvriga. Biosensori valmistamiseks keriti immobiliseeritud ensüümiga niit (19 cm) andurile [35, 40, 41].

2.5 Lahuste valmistamine

Puhverlahused valmistati Milli-Q veega (25 °C juures eritakistus 18,2 MΩ·cm), mõõtmiste läbiviimiseks kasutati 0,1 M fosfaatpuhverlahust (pH=6,50).

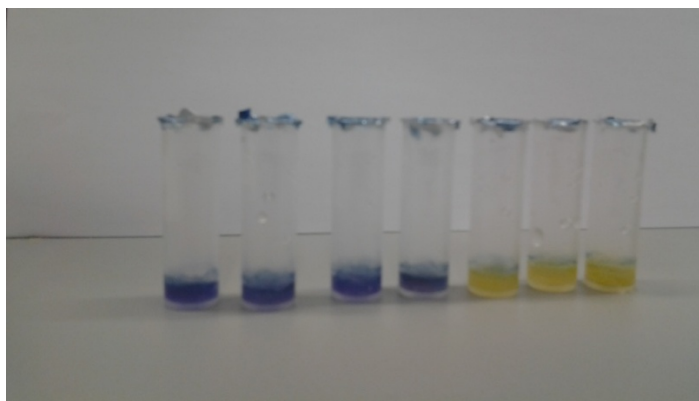
Valmistati 0,2 M glükoosi lahus, mis oli valmistatud fosfaatpuhverisse (0,1 M pH=6,5) ja sellest lahusest valmistatud lahjendused, mida kasutati süsteemi kalibreerimiseks.

2.6 Piimaproovide kogumine ja proovide ettevalmistus

Piima proovid on saadud Maaülikooli Eerika katselaudast. Piima proovid, mis on võetud perioodil 22.06-29.06.2014 ravi all olevatelt lehmadel, külmutati koheselt peale lüpsmist -20°C -ni ning sulatati 4°C juures vahetult enne katset. Lehma, kes põdes mastiiti, raviti kolm päeva Lactocloxiga, mis sisaldab 75 mg ampitsilliini ja 200 mg kloksatsilliini [42]. Katseteks lahjendati piima proove 1:4 fosfaatpuhvriga ning lisati 0,01% Tween 20't.

2.7 Antibiootikumijääkide määramine Delvotest'i abil

Ühekordse pipeti abil kantakse 0,1 ml piimaproovi testile, mille põhi on kaetud tahke söötmega, mis sisaldab *Bacillus stearothermophilus* bakterit ning seejärel inkubeeritakse testi kolm tundi temperatuuril 64 °C. Antibiootikumide olemasolu korral piimaproovis värvub test lillaks (joonis 4). Delvotesti katsete puhul lisati puhta piima proovidele bensüülpenitsilliini kontsentratsioonidel vahemikus 0.625 – 500ppb.



Joonis 4. Delvotestiga saadavad tulemused. Antibiootikumide olemasolu korral värvub test lillaks (vasakpoolsed testid); paremal pool on antibiootikumide jääke mittesisaldavad testid.

3. TULEMUSED JA ARUTELU

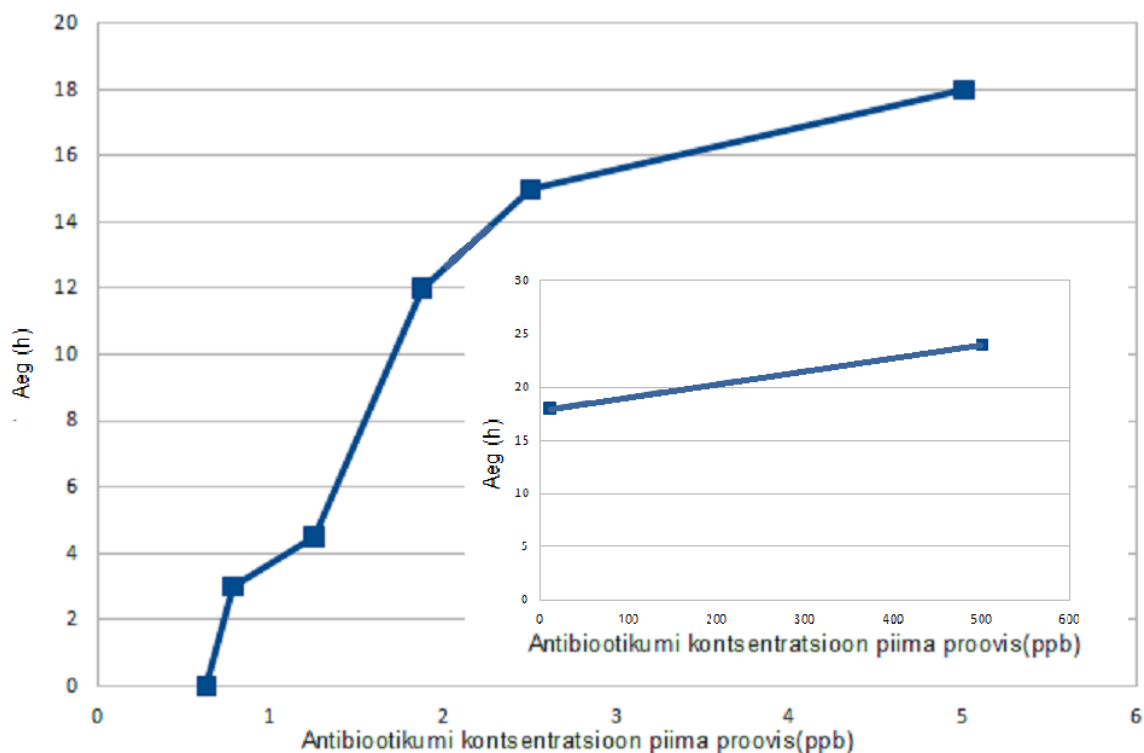
3.1 Delvotest'i tundlikkuse alampiiri määramine penitsilliin G suhtes

Esmalt kontrolliti kasutatavate Delvotestide määramise alampiiri XS105 dualrange suhtes. Testi tundlikkuse alampiiriks on pakendil märgitud 1,5ng/g ehk 1,5 ppb [43], kuid katsetes leiti, et penitsilliin G kontsentratsioonil 0,781ppb andis testis positiivse vastuse. Delvotesti negatiivne vastus saadi penitsilliin G kontsentratsioonil piimas 0,625ppb. Sellest võib järeldada, et Delvotestide tegelik tundlikkus on palju kõrgem kui pakendil märgitud. Kuna maksimaalne lubatud kogus penitsilliin G sisaldusele on 4 ppb, siis testi alusel hinnatakse piima mittekvaliteetseks juba ka penitsilliin G 5 korda madalamal kontsentratsioonil.

Testide tegeliku määramispiiri uurimisel leiti, et testi tulemus muutub vastavalt sellele, mis temperatuuril ja kui kaua proove enne analüüsimist eelnevalt hoitakse. Algselt positiivsed proovid muutusid seismisel negatiivseks, mis viitab sellele, et osa proovis leiduvast aktiivsest antibiootikumist proovide seismisel inaktiveerus.

Säilitamise mõju antibiootikumide sisalduse määramisele 24 tunni jooksul seisnud proovidele uuriti kolmel erineval temperatuuril: 4° C, 20° C ja 37° C. Need on tüüpilised temperatuurid, mille juures piima sageli hoiustatakse. Selgus, et proovide säilitamine 4° C juures kuni 24 tundi ei mõjutanud analüüsi tulemust, küll aga muutusid algselt antibiootikumijääkide osas positiivsed piimaproovid negatiivseteks säilitamisel temperatuuridel 20° C ja 37° C.

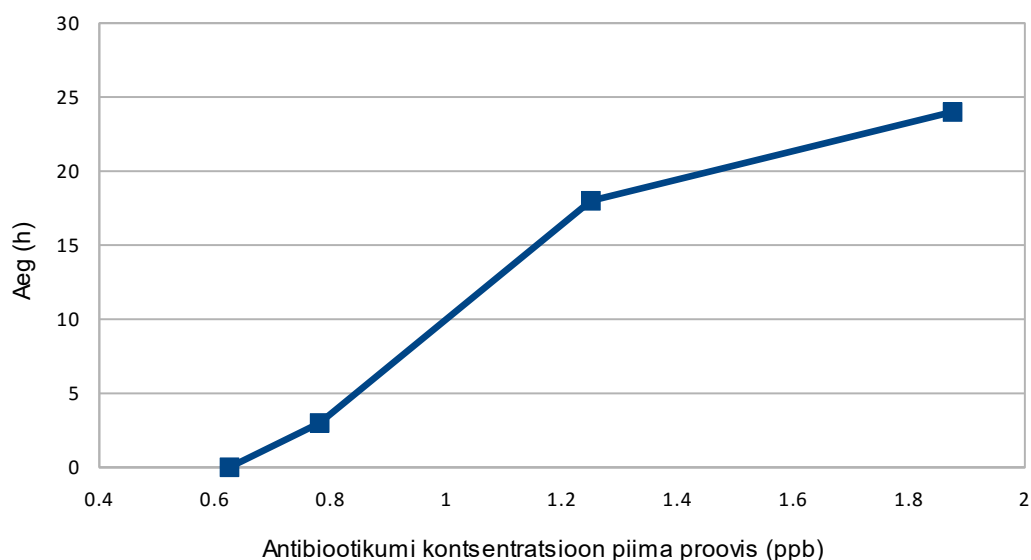
Joonisel 5 on toodud proovide hoidmise aeg, mille korral erineva penitsilliini kontsentratsiooniga proovid muutusid negatiivseks 37° C juures. Delvotest oli kindlalt negatiivne penitsilliin G kontsentratsioonil 0,625 ppb, kuid ülejäänud proovid muutusid negatiivseks alles teatud aja möödumisel: näiteks 0,781 ppb proovi tulemus muutus negatiivseks juba pärast kolme tundi, 1,25ppb - 4,5 tunni järel, 1,875ppb - 12. tunnil; 2,5ppb - 15. tunnil ja 5 ppb - 18 tundi inkubeerimist.



Joonis 5. Delvotesti SP NT tulemuste sõltuvus penitsilliin G sisaldavate piimaproovide inkubeerimise ajast (temperatuur = 37°C)

Penitsilliin G kõrgematel kontsentratsioonidel piimas muutus Delvotesti tulemus negatiivseks 100 ppb juures 18 tunni ning 500 ppb juures 24 tunni möödudes. Katsed teostati ka penitsilliin G kontsentratsioonidel 2500 ppb ja 5000 ppb, kuid 24 tunni möödudes muudatusi ei olnud. See tähendab, et kui piima proove on enne analüüsimist soojas transporditud, siis Delvotestiga usaldusväärseid tulemusi ei saa.

Analoogsed mõõtmised viidi läbi ka temperatuuril 20°C. Nagu eeldati, toimus testi tulemuste muutumine positiivsest negatiivseks võrreldes kõrgema temperatuuriga (37°C) pikema aja jooksul (joonis 6). Nii toimus muudatus 1,25 ppb kontsentratsiooniga proovil alles 18 tunni möödudes ning 24 tunni jooksul toimus positiivse proovi muutumine negatiivseks piimaproovis, milles penitsilliin G sisaldus oli 1,875 ppb.



Joonis 6. Delvotesti SP NT tulemuste sõltuvus penitsilliin G sisaldavate piimaproovide inkubeerimise ajast (temperatuur = 20°C)

Võrreldes tootja poolt paika pandud tundlikusega on tegelikkuses testid umbes kaks korda tundlikumad ning saadud tulemuste põhjal saab veel väita, et nii joonisel 5 kui 6 tekkinud sirge alla poole jääv piirkond sobib veel testide teostamiseks saades usaldusväärseid tulemusi.

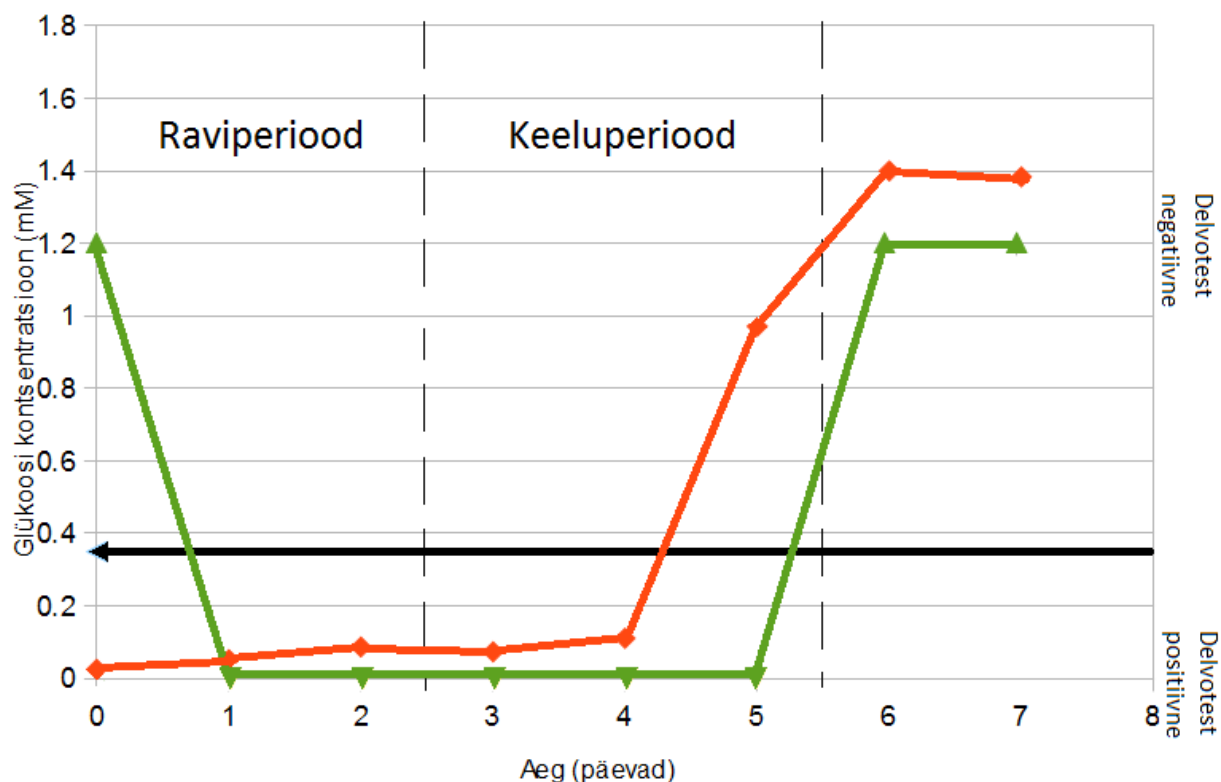
3.2 Antibiootikumijääkide määramine ravialuste lehmade piimas biosensoriga.

Piima, mis oli saadud ravialuselt lehmalt ravi ajal ja pärast ravi lõppemist keeluperioodil, uuriti biosensormeetodi abil ning saadud tulemuse võrreldi Delvotestiga. Keeluperiood on ravile järgnev periood, millal toimub ravi all olnud lehmalt antibiootikumi väljutamine kehast. Keeluperioodi pikkuse kehtestamisel eeldatakse, et selle lõppemisel piim vastaks jälle kehtestatud nõuetele. Keeluperioodil ravitud lehma piima ei kasutata, vaid piim kuulub hävitamisele. Penitsilliinidega ravimise korral on keeliperioodiks 3 päeva [42].

Kuna on teada, et β -laktaamne antibiootikum ei inhibeeri glükoosi- ja galaktoosi

oksüdaasi siis on võimalik määrata β -laktaamse antibiootikumi olemasolu piimaproovides kasutades selleks glükoosi biosensori abil saadud glükoosi kontsentratsiooni [44].

Glükoosi biosensori abil mõõdeti ravialuse lehma piimas glükoosi kontsentratsiooni: nii ravi ajal, keeluperioodil kui ka pärast keeluperioodi lõppu. Glükoosi kontsentratsioon eri päevadel võetud piimaproovides on toodud joonisel 7, kusjuures võrdlusena on toodud glükoosi kontsentratsioon tervete lehmade piimas, mis on 0.35 ± 0.065 mmol/L [39].



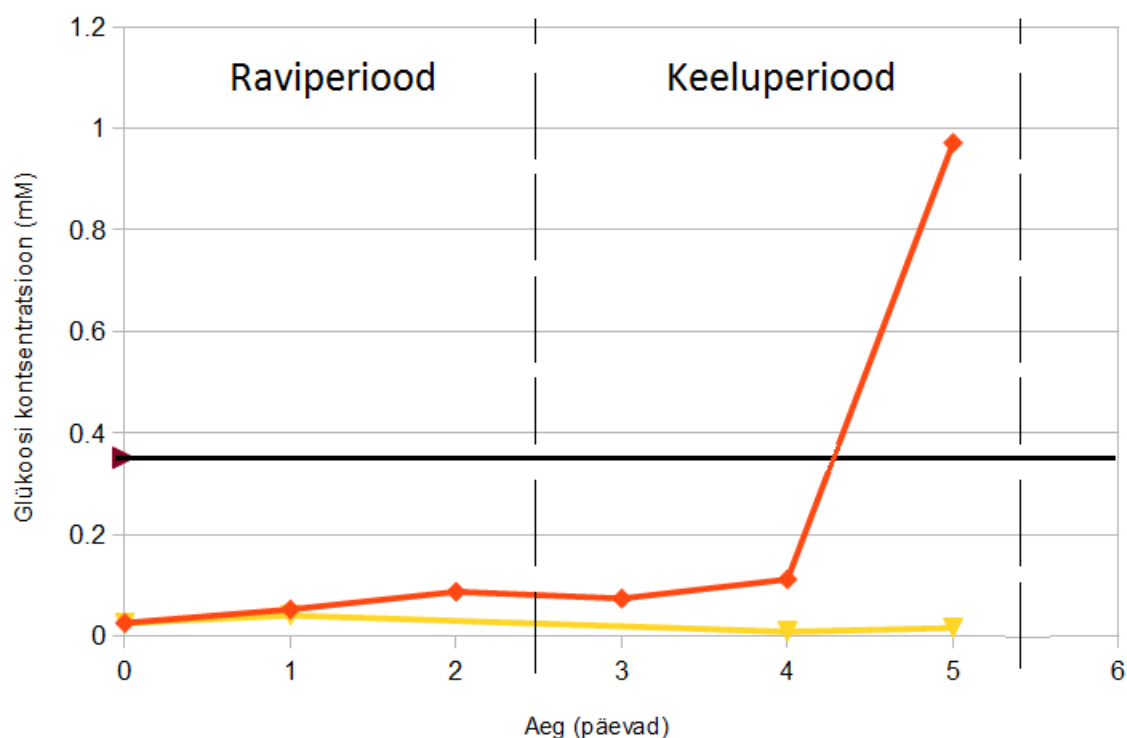
Joonis 7. Glükoosi kontsentratsiooni Lactacloxiiga ravitud lehma ravi aegsetes ja keeluperioodil võetud piimaproovides. Mastiiti põdevat lehma raviti kolm päeva Lactocloxiiga, mis sisaldab 75 mg ampitsilliini ja 200 mg kloksatsilliini, millele järgnes 3 päevane keeluperiood. (—) tavapärane glükoosi kontsentratsiooni piimas (0.35 ± 0.065 mmol/L) (◆) glükoosi kontsentratsioon, (▼) Delvotest positiivne, (▲) Delvotest negatiivne.

Nagu jooniselt 7 näha on ravi ja keeluperioodi ajal glükoosi tase ravialuste lehmade piimas tavapärasest ligikaudu 3 korda madalam ning see suureneb keeluaia lõpus järsult üle tavapärase. Selline järsk suurenemine võib olla seotud sellega, et pärast antibiootikumiravi

lõppu pole lehma tavapärane mikrofloora veel täielikult taastunud. Bakterite arvu suurenemist kinnitab ka võrdlusanduri signaali alusel arvutatud proovide hapnikutarbe suurenemine [39].

Ravialuse lehma piima analüüsi lisaks biosensorile ka Delvotesti abil. Jooniselt 7 on näha, et Delvotesti ning biosensori abil saadud tulemused väga heas korrelatsioonis ning glükoosi biosensoriga on võimalik detekteerida kehtestatud piirnorme ületavaid antibiootikumide jääkkontsentratsioone piimas. Võrreldes Delvotesti tegemiseks kuluva 3 tunniga, on biosensori abil võimalik tulemusi saada vähem kui 3 minuti jooksul.

Käesolevas töös saadud tulemused langevad hästi kokku glükoosi kontsentratsiooni varasemate mõõtmistega (joonis 8), mis on tehtud sama biosensorsüsteemiga Bimoxyl'iga (ühekordne doos sisaldab 150 mg amoksisilliini looma 10 kg kehakaalu kohta) ravitud lehmade piimas [39].



Joonis 8. Glükoosi kontsentratsioonid Lactacloxiga või Bimoxyl LAg ravitud lehmade ravi aegsetes ja keeluperioodil võetud piimaproovides. Raviperiood kestis 3 päeva, millele järgnes 3 päevane keeluperiood. (—)tavapärane glükoosi kontsentratsiooni piimas (0.35 ± 0.065 mmol/L) (♦) Lactaclox, (▼) Bimoxyl LA.

4. KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida penitsilliinide jääkide määramise võimalusi biosensoriga ning võrrelda saadud tulemusi käesoleval ajal laialt kasutatava Delvotesti abil tehtavate piima analüüsidega.

Delvotesti määramispiiri kontrollimisel selgus, et selle abil penitsilliin G jääkide määramise alampiir on palju madalam kui pakendil märgitud, see tähendab, et test on tegelikkusest palju tundlikum. Tootja poolt määratud tundlikuseks oli 1,5 ppb, kuid tegelikkuses oli alampiir kaks korda madalam ning jäi 0,781ppb ja 0,625ppb vahele. Samuti leiti, et testi tulemus muutub vastavalt sellele, kui kaua ja mis temperatuuri juures piimaproove eelnevalt hoiustatakse: mida kauem proov enne testimist seisis, seda kõrgem oli määramispiir. Delvotesti määramispiir ületas lubatud antibiootikumide jääkide kontsentratsiooni (MRL) piimaproovide säilitamisel 37°C juures üle 17 tunni.

Delvotesti ning biosensori abil analüüsiti ravialuselt lehmalt kogutud piimaproove ning leiti, et biosensoriga mõõdetud glükoosi tasemed olid väga heas korrelatsioonis Delvotestiga saadud tulemustega ning glükoosi biosensoriga on võimalik detekteerida kehtestatud piinorme ületavaid antibiootikumide jääkkontsentratsioone piimas. Võrreldes Delvotesti tegemiseks kuluva 3 tunniga, on biosensori abil võimalik tulemusi saada vähem kui 3 minuti jooksul.

5. KASUTATUD KIRJANDUS

- [1] European Medicines Agency. Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010 (EMA/88728/2012). Second ESVAC report.
- [2] J. Wang , J. D. MacNeil, J. F. Kay, Chemical analysis of antibiotic residues in food, Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2011.
- [3] T. T. Tidwell, Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of β -Lactam Synthesis Angewandte Chemie International Edition, **2008**, 47, 1016 - 1020.
- [4] M. G. P. Page, Antibiotic Discovery and Development, **2012**, 79 - 117.
- [5] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. Stahl, D. P. Clark, Brock's Biology of microorganisms, **1997**, 13, 771 – 774.
- [6] S. L. Gorbach, J. G. Barlett, N. R. Blacklow, Infectious Diseases third edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- [7] A. U. Khan, Current Trends In Antibiotic Resistance In Infectious Diseases, New Delhi, I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, 2009, 25-165.
- [8] T. Rinken, S. Rinken, Ülevaade veterinaarsete antibiootikumide müügist Eestis aastatel 2009 – 2012, **2012**.
- [9] A. R. Hauser, Antibiotic Basics for Clinicians, **2008**, 3, 18 – 45.
- [10] H. Öztürk, E. Ozkirimli, A. Özgür, Classification of Beta-Lactamases and Penicillin Binding Proteins Using Ligand-Centric Network Models, Avaldamiseks vastu võetud, alates 17.02.2015 saadaval veebist, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0117874>.
- [11] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, **2010**, 423 - 435.
- [12] Commission Regulation (EU) No. 37/2010, ec.europa.eu/health/files/mrl/mrl_20101212_consol.pdf, 2010.
- [13] L. Kantiani, M. Farre, B. Damia, Analytical methodologies for the detection of [beta]-lactam antibiotics in milk and feed samples. Trends in Analytical Chemistry, **2009**, 28, 729 – 744.

- [14] S. Ergin Kaya, A. Filazi, Determination of Antibiotic Residues in Milk Samples, **2010**, 16, 31-35.
- [15] H. A. Martins-Júnior, T. A. Kussumi, A. Y. Wang, D. T. Lebre, A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, **2007**, 18, 397-405.
- [16] C. Van de Water, N. Haagsma Analysis of chloramphenicol residues in swine tissues and milk: comparative study using different screening and quantitative methods. *Journal of Chromatography B – Biomedical Application*, **1991**, 566, 173-185.
- [17] W. A. Moats , R. D. Romanowski : Multiresidue determination of β -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up. *Journal of Chromatography A* **1998**, 812, 237-247.
- [18] P. Neaves, Monitoring antibiotics in milk – The changing world of test methods, **1999**, 15 – 23.
- [19] S. L. Hennart, J. Faragher, Validation of the Delvotest SP NT DA, *Journal of AOAC International*, Volume 95, Nr 1, **2012**, 252-260.
- [20] C. Bell, D. Scannella, An evaluation of the LacTek Beta-Lactam Milk Screening Kit. *International Journal of Dairy Technology*, **1994**, 47, 15 – 16.
- [21] R. Babington, S. Matas, M. P. Marco, and R. Galve. Current bioanalytical methods for detection of penicillins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**; 403, 1549–1556.
- [22] K. Narsaiah, S. N. Jha, R. Bhardwaj, R. Sharma, and R. Kumar. Optical biosensors for food quality and safety assurance – A review. *Journal of Food Science and Technology* **2012**; 49, 383–406.
- [23] G. Cacciatore, M. Petz, S. Rachid, R. Hakenbeck, and A. A. Bergwerff. Development of an optical biosensor assay for detection of beta-lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x*. *Analytica Chimica Acta* **2004**; 520, 105–115.
- [24] E. Gustavsson, P. Bjurling, J. Degelaen, and A. Sternesjö. Analysis of beta-lactam antibiotics using a microbial receptor protein-based biosensor assay. *Food and Agricultural Immunology* **2002**; 14, 121–131.
- [25] A. Sternesjö and E. Gustavsson. Biosensor analysis of beta-lactams in milk using the

carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein. *Journal of AOAC International* **2006**; 89, 832–837.

[26] E. Gustavsson, J. Degelaen, P. Bjurling, and A. Sternesjö. Determination of beta-lactams in milk using a surface plasmon resonance-based biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**; 52, 2791–2796.

[27] J. Lamar and M. Petz. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices. *Analytica Chimica Acta* **2007**; 586, 296–303.

[28] S. J. Setford, R. M. Van Es, Y. J. Blankwater, and S. Kröger. Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid beta-lactam quantification in milk. *Analytica Chimica Acta* **1999**; 398, 13–22.

[29] E. Gustavsson, P. Bjurling, and A. Sternesjö. Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity. *Analytica Chimica Acta* **2002**; 468, 153–159.

[30] A. M. Ferrini, V. Mannoni, G. Carpico, and G. E. Pellegrini. Detection and identification of beta-lactam residues in milk using a hybrid biosensor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**; 56, 784–788.

[31] S. Das, N. Kumar, R. H. Vishweswaraiiah, L. Haldar, M. Gaare, V. K. Singh, and A. K. Puniya. Microbial based assay for specific detection of beta-lactam group of antibiotics in milk. *Journal of Food Science and Technology* **2014**; 51, 1161–1166.

[32] G. E. Pellegrini, G. Carpico, and E. Coni. Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. *Analytica Chimica Acta* **2004**; 520, 13–18.

[33] C. Chafer-Pericas, A. Maquieira, and R. Puchades. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry* **2010**; 29, 1038–1049.

[34] L. Kantiani, M. Farre, and B. Damia. Analytical methodologies for the detection of [beta]-lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends in Analytical Chemistry* **2009**; 28, 729–744.

[35] K. Kivirand, M. Kagan, T. Rinken, Biosensors for the Detection of Antibiotic Residues in Milk, **2015**, 425 – 456.

- [36] N. A. Karaseva and T. N. Ermolaeva. Piezoelectric immunosensors for the detection of individual antibiotics and the total content of penicillin antibiotics in foodstuffs. *Talanta* **2014**; 120, 312–317.
- [37] R. B. de Brito; R. G. Junqueira, Determination of Beta-Lactam residues in milk by high performance liquid chromatography, **2006**, 49, 41-46.
- [38] R. L. Althaus, M. P. Molina, M. Rodriguez, N. Fernandez, Detection limits of beta-lactam antibiotics in ewe milk by penzym enzymatic test, *Journal of Food Protection*, Nr 11, **2001**, 1653-1877, 1844-1847.
- [39] M. Kagan, G. Printsman, K. Kivirand, T. Rinken Biosensing Penicillin Residues in Raw Milk, *Analytical Letters*", **2016**, in press (DOI:10.1080/00032719.2016.1202957).
- [40] K. Kivirand, A. Floren, M. Kagan, T. Avarmaa, T. Rinken , R. Jaaniso, Analyzing the biosensor signal in flows: Studies with glucose optrodes, **2015**, 74-80.
- [41] K. Kivirand, T. Rinken, *Sens. Lett.* 7, **2009**, 580–585.
- [42] <http://www.zoovet.ee/tooted/ravimidveterinaarsedtooted/infektsioonivastasedravimid/antibakteriaalseteainetekombinatsioonidudarasiseseks/?product=261>
- [43] http://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/en_US/home.html
- [44] A. Gornischeff, T. Rinken, Calculating the output signal parameters of a lactose bienzymatic biosensing system from the transient phase response, **2011**, 60, 2, 136–140.

Determination of the residues of β -lactam antibiotics in milk with biosensor

Eleriin Peterson

.Summary

The aim of this study was to explore the detection of penicillin residues using biosensor and to compare the results with Delvotest which is currently used for milk analysis.

It was found that detection limits of β -lactams with Delvotest were lower indicated by producer. The declared detection limit was at 1.5 ppb but actually the detection limit was between 0,781 ppb and 0.625 ppb. The author also found that the Delvotest results depend on how long and at what temperature the milk samples have been stored. The test results didn't change when the sample was stored at 4° C, but if the milk samples were kept at 20° C or 37° C, the detection limits increased.

Both Delvotest and biosensor were used to analyze milk samples from cows which were under antibiotic treatment. It was found out that the glucose levels in milk which contained antibiotic residues over established MRL values were considerably lower than glucose levels in normal milk. The biosensor results were in good correlation with Delvotest analyses and can be used for rapid detection of antibiotic residues in milk. The application of biosensors enables to obtain results within 3 minutes.

.Infoleht

β -laktaamide jääkide määramine piimas biosensori abil

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida penitsilliinide jääkide määramise võimalusi biosensoriga ning võrrelda saadud tulemusi käesoleval ajal laialt kasutatava Delvotesti abil tehtavate piima analüüsidega. Delvotesti määramispiiri kontrollimisel selgus, et penitsilliin G jääkide määramise alampiir on palju madalam kui pakendil märgitud, see tähendab, et test on tegelikkusest palju tundlikum. Delvotesti ning biosensori abil võrreldi ravialuselt lehmalt kogutud piimaproove ning leiti, et erinevatel meetoditel saadud tulemused on väga heas korrelatsioonis.

Märksõnad: *biosensor, Delvotest, piima kiire analüüs, penitsilliinid*

Determination of the residues of β -lactam antibiotics in milk with biosensor

The aim of this study was to explore the possibilities of determination of penicillin residues in milk with a biosensor and to compare the biosensor and with commonly used Delvotest results. It was found that the detection limit of penicillin G with Delvotest was lower than indicated by the manufacturer. . The milk of treated cows was analyzed both with biosensor and Delvotest, and it was found that the results were in good correlation.

Keywords: *biosensor, Delvotest, rapid milk analysis, penicillins*

Taotlus lõputöö avaldamisele piirangute kehtestamiseks ja lõputöö kaitsmise kinniseks kuulutamiseks

Nimi	Eleriin Peterson
Sünniaeg	10.12.1992
Õppekava	Keemia
Juhendaja	Margarita Kagan ja Toonika Rinken
Lõputöö pealkiri	β -laktaamide jääkide määramine piimas biosensori abil

☒ Palun **mitte avaldada** minu lõputööd kuni **kuupäev 25.08.2019**

- ☐ teistele isikutele kuuluvate varaliste autoriõiguste tõttu.
- ☐ kuna töö sisaldab isikuandmeid, mille avaldamiseks pole andmesubjekti nõusolekut.
- ☐ riigisaladuse tõttu.
- ☐ ärisaladuse tõttu.
- ☒ lõputöö avaldatakse tulevikus teadusartiklina.
- ☐ muul põhjusel.

Selgitus (põhjendus, miks taotletakse piiranguid ja miks just selliseks perioodiks):

Töös saadud tulemused on plaanis avaldada teadusartiklina.

☐ Palun kuulutada minu **lõputöö kaitsmine kinniseks**.

Selgitus (põhjendus, miks taotletakse lõputöö kaitsmise kinniseks kuulutamist):

Taotlusele on lisatud järgmised lisad (täita juhul, kui taotlusel on lisad, nt äriühingu poolne kinnitus, et töö sisaldab ärisaladust):

- 1.
- 2.

Kuupäev ja üliõpilase allkiri: _____ 18.08.2016

Kuupäev ja juhendaja allkiri: